



УДК 619:636,22/28

А.В. ПАВЛОВ, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
Е.Ю. СМЕРТИНА, доктор ветеринарных наук, заведующая лабораторией,
Н.А. ДОНЧЕНКО, доктор ветеринарных наук, директор

*ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири
и Дальнего Востока Россельхозакадемии
e-mail: arginin@mail.ru*

АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО НА КУЛЬТУРУ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Представлены результаты исследований по изучению эффективности антимикробного действия одного из методов фотодинамической терапии на культуру *Staphylococcus aureus*. В работе использовали источник оптического излучения с длиной волны 620 нм и выходной мощностью 3500 мВт. В качестве фотосенсибилизатора применяли органический краситель метиленовый синий. Установлено образование свободных радикалов в растворе фотосенсибилизатора при воздействии оптического излучения со специфичной длиной волны, сопровождающееся образованием электрического потенциала 20 мВ на погруженных в раствор электродах. Вносимое в облучаемый раствор фотосенсибилизатора органическое вещество поглощает часть свободных радикалов, что сопровождается понижением электрического потенциала на электродах до 10 мВ. Антимикробное действие 0,02%-го раствора метиленового синего красителя в отношении культуры *S. aureus* при облучении достоверно повышается на 31,17 %, достигая эффективности антибиотиков.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, фотодинамическая терапия, метиленовый синий краситель, оптическое излучение, свободные радикалы.

Экспансия антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов вызывает необходимость поиска и разработки новых антимикробных средств, основанных на отличных от антибиотикотерапии принципах. Одними из таких средств, обладающих необходимым потенциалом, являются фотосенсибилизаторы – вещества, способные диссоциировать при поглощении квантов оптического излучения со специфичной длиной волны, образуя при этом свободные радикалы, обладающие цитотоксическим действием. Данное свойство используется в терапии онкологических заболеваний. Этот перспективный метод лечения называется фотодинамическая терапия, однако в настоящее время в клинической практике он используется в единичных случаях или только в экспериментальных целях [1]. Самыми распространенными применяемыми фотосенсибилизаторами являются фталоциановые соединения или соединения на основе порфиринов [2]. Свойство фотосенсибилизаторов – накапливаться в патологически измененных клетках организма и высвобождать под воздействием оптического излучения свободные радикалы, обладающие цитостатическим действием, по нашему мнению, может быть использовано в терапии инфекционных заболеваний, особенно имеющих локальный характер. Имеются отдель-

ные работы по изучению воздействия фотосенсибилизаторов с последующим облучением на условно-патогенные микроорганизмы. Например, установлена инактивация клеток *S. aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в результате воздействия фталоциановых соединений цинка в качестве фотосенсибилизатора и последующей обработки лазерным излучением мощностью 50 мВт, с длиной волны 1,5 мкм и экспозицией 10 мин [3]. Также есть данные об эффективной терапии кандидоза полости рта, вызванного антибиотикорезистентным штаммом *Candida albicans*, в ходе которой применяли в качестве фотосенсибилизатора метиленовый синий краситель и кадмий-галлий-фосфидный лазер с длиной волны 620 нм и экспозицией 5 мин [4]. Таким образом, существует определенный потенциал использования фотосенсибилизаторов в терапии инфекционных заболеваний, особенно имеющих локальный характер.

Цель нашей работы – изучение антимикробного действия метиленового синего красителя как фотосенсибилизатора.

Для достижения цели были проведены два опыта. В ходе первого опыта планировали изучить появление свободных радикалов в растворе метиленового синего при воздействии на него оптического излучения по изменению электропроводности раствора; второго – изучить воздействие метиленового синего красителя и последующего облучения на культуру *S. aureus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовали 0,02%-й раствор метиленового синего красителя в дистиллированной воде, имеющий спектр поглощения оптического излучения в диапазоне 618–668 нм, два пластинчатых электрода, изготовленных из OFC-меди (бескислородной) с площадью погружаемой поверхности 1260 мм² каждый, аналоговый осциллограф GW Instek GOS-6051, а также специально разработанный LED-облучатель с длиной волны 620 нм и выходной мощностью 3500 мВт. Опыт проведен следующим образом: в 0,02%-й водный раствор метиленового синего погружали медные электроды, закрепленные на изолирующем основании, на расстоянии 10 мм взаимно параллельно. К электродам гибкими проводниками был подключен осциллограф в режиме измерения постоянного напряжения. Затем между электродами размещен LED-облучатель. При его включении плотность мощности оптического излучения составила 0,55 Вт/см².

В бактериологических исследованиях использовали LED-облучатель, полевой изолят *S. aureus*, набор дисков с антибиотиками для определения антибиотикорезистентности. Также использовали аналогичные диски с метиленовым синим, изготовленные самостоятельно. В ходе опыта проводили сплошной посев культуры *S. aureus* с концентрацией 1 млрд КОЕ/мл на мясопептонный агар, затем на поверхность питательной среды помещали диски: в 1-й опытной группе – с антибиотиками, во 2-й – с метиленовым синим без последующего облучения, в контрольной группе – с метиленовым синим и последующим облучением в течение 10 мин. Посевы инкубировали в течение 24 ч, затем измеряли диаметр зоны задержки роста микроорганизмов. Полученные результаты статистически обрабатывали по Фишеру в программе MS Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе первого опыта обнаружена следующая закономерность: на электродах, помещенных в раствор метиленового синего красителя, до облучения самого раствора отсутствует какой-либо электрический потенциал. Включение LED-облучателя и воздействие на раствор фотосенсибилизатора оптического излучения, лежащего в спектре его поглощения, сопровождается появлением электрического потенциала на электродах, который через 4 мин достигает своего максимума и составляет $20 \pm 0,5$ мВ ($n = 5$). Это свидетельствует об образовании в растворе частиц с разноименными электрическими зарядами (ионов, свободных радикалов), вызывающих поляризацию электродов. Внесение в облучаемый раствор органического вещества (навеска мясopептонного агара массой 0,5 г) сопровождается моментальным падением напряжения на электродах до $10 \pm 0,5$ мВ ($n = 5$), свидетельствуя о поглощении части свободных радикалов органическим веществом. Следовательно, воздействуя фотосенсибилизаторами на микроорганизмы с последующим облучением, можно ожидать связывания с ними свободных радикалов и изменения свойств микроорганизмов.

Во втором опыте обнаружили увеличение диаметра зоны задержки роста в контрольной группе после воздействия оптического излучения. Результаты представлены в таблице.

Из приведенных данных следует, что раствор метиленового синего красителя даже без облучения обладает некоторым антимикробным действием. Облучение раствора достоверно повышает его антимикробные свойства, в данном случае на 31,17 %, при этом антимикробное действие облученных дисков с метиленовым синим превышает действие стрептомицина на 8,24 %, ампициллина на 18,82 и амоксициллина на 1,2 %, но достоверно ус-

Диаметр зоны задержки роста *S. aureus* под действием различных препаратов

Группа	Диаметр зоны задержки роста, см		
	Препарат	$M \pm m (n = 5)$	Разница с контролем, %
Контрольная	Метиленовый синий + облучение	$3,4 \pm 0,36$	
Опытная:			
1-я	Стрептомицин	$3,12 \pm 0,23$	8,24
	Энрофлоксацин	$4,88 \pm 0,48^*$	-43,53
	Тетрациклин	$4,52 \pm 0,1^*$	-32,94
	Ампициллин	$2,76 \pm 0,49$	18,82
	Амоксициллин	$3,36 \pm 0,51$	1,2
	Гентамицин	$4,46 \pm 0,41$	-36,47
	Левомецетин	$4,24 \pm 0,24$	-24,7
	Тилозин	$3,28 \pm 0,18$	-3,53
2-я	Метиленовый синий без облучения	$2,34 \pm 0,09^*$	31,17

* $p < 0,05$.

тупает действию энрофлоксацина и тетрациклина, а также гентамицина, левомицетина и тилозина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования свидетельствуют о наличии сравнимого с антибиотиками антимикробного действия у облученного раствора метиленового синего красителя. Повышение антимикробного действия обусловлено свободными радикалами, образующимися при поглощении оптического излучения со специфичной для фотосенсибилизатора длиной волны. Таким образом, метиленовый синий краситель может быть использован в качестве фотосенсибилизатора как препарат с выраженным антимикробным действием в фотодинамической терапии заболеваний, вызванных *S. aureus*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Pinthus J.H., Bogaards A., Weersink R. et al. Photodynamic therapy for urological malignancies: past to current approaches // J. Urol. – 2006. – Vol. 175 (4). – P. 1201–1207.
2. Detty M.R., Gibson S.L., Wagner S.J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy // J. of Medicinal Chemistry. – 2004. – Vol. 47 (16). – P. 3897–3915.
3. Mantareva V., Kussovski V., Angelov I. et al. Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2007. – Vol. 15 (14). – P. 4829–4835.
4. Pupo Y.M., Gomes G.M., Santos E.B. et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes // Acta Odontol Latinoam. – 2011. – Vol. 24 (2). – P. 188–192.

Поступила в редакцию 04.04.2013

A.V. PAVLOV, Candidate of Science in Biology, Senior Researcher,
E.YU. SMERTINA, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Laboratory Head,
N.A. DONCHENKO, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Director

*Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East,
Russian Academy of Agricultural Sciences
e-mail: arginin@mail.ru*

ANTIMICROBIAL ACTION OF PHOTOSENSITIZER METHYLENE BLUE ON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

There are presented results of investigations on studying the effectiveness of antimicrobial action of a photodynamic therapy method on *Staphylococcus aureus* cultures. A LED light source with 620 nm wavelength and 3500 mW output power was used in an experiment. The organic methylene blue dye (MBD) was used as a photosensitizer. Free radicals were determined to be generated in the solution as influenced by photosensitizer optical radiation with a specific wavelength, accompanied by forming the electric potential of 20 mV at the copper electrodes immersed in the solution. The organic matter introduced into the irradiated solution of photosensitizer absorbs a part of free radicals, which is accompanied by a decrease in the electric potential across the electrodes to 10 mV. The antimicrobial action of 0.02% solution of MBD against *Staphylococcus aureus* cultures, when irradiated, significantly increased by 31.17%, reaching the efficacy of antibiotics.

Keywords: antibiotic resistance, photodynamic therapy, methylene blue dye, optical radiation, free radicals.